云　南　植　物　研　究　2008，30（5）：624～628
Acta Botanica Yunnanica　DOI：10.3724 SP.J.1143.2008.07273

曲霉属真菌在普洱茶后发酵中的作用*

陈可可，张香兰，朱宏涛，杨崇仁，张颖君**
（中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室，云南 昆明　650204）

摘要：为阐明微生物在普洱茶后发酵过程中的作用及其机制，本文进行了普洱茶温湿度试验，并利用从普洱茶后发酵堆中分离鉴定的优势曲霉属真菌，进行接种试验和专用菌剂的发酵生产试验。结果提示，只有在微生物的作用下，普洱茶才具特有的感官特性，曲霉属真菌能控制后发酵的过程，改变茶叶的感官特性。曲霉属真菌的种类及组合对普洱熟茶的茶多酚组成与含量，以及没食子酸、茶氨酸、咖啡因等特征成分的含量均有显著的影响。因此，应用专用菌剂进行后发酵生产，能加快普洱茶的熟化速度，提高发酵成功率，保证产品质量的稳定性，使普洱熟茶的规范化生产成为可能。

关键词：曲霉属；普洱茶；后发酵
中图分类号：Q 946　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700（2008）05-624-05

The Effects of *Aspergillus* on the Post-fermentative Process of Pu-Er Tea

CHEN Ke-Ke，ZHANG Xiang-Lan，ZHU Hong-Tao，YANG Chong-Ren，ZHANG Ying-Jun**
（*State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China，Kunming Institute of Botany，Chinese Academy of Sciences*，Kunming 650204，China）

Abstract: In order to explain the effects of microorganism on the post-fermentative process of Pu-Er tea，the temperature and humidity tests，inoculation tests with several *Aspergillus* species，which were previously purified and identified as the preponderant microbe from the fermentative stacks of Pu-Er tea，as well as the post-fermentation tests with specially prepared microbial reagents with these *Aspergillus* species are carried out. The results showed that the special characteristic sense of Pu-Er tea was coming from the effects of these *Aspergillus* species. The specially prepared microbial reagents can not only control the post-fermentative process，but also change the characteristic sense，as well as influence to the contents of polyphenols，catechins，gallic acid，theanin and caffeine in Pu-Er tea. In addition，it could improve the riping speeds，the successful rate，as well as the quality stability of Pu-Er tea. With the specially prepared microbial reagents，a standardized industrial production of Pu-Er tea becomes possible.

Key words: *Aspergillus*；Pu-Er tea；Post-fermentation

普洱茶为云南特色茶叶品种，以普洱生茶（晒青毛茶）为原料通过后发酵过程生产的普洱熟茶具有特殊的风味，受到消费者的喜爱，有广阔的市场前景。普洱茶的后发酵生产通常以“渥堆”的方式，依靠环境微生物的自然感染发酵进行。由于生产环境的影响，参与发酵的微生物种类不明，发酵过程不稳定，很难控制与规范，导致产品质量不稳定。我们已报道的化学研究结果表明（周志宏等，2000，2006；折改梅等，2008），普洱熟茶的化学成分与其原料普洱毛茶有显著的差别。我们从普洱熟茶中分离到的一系列特征成分，如：儿茶素类与有机酸结合的新型内酯成分

* 基金项目：国家科技支撑计划课题（2007BAD58B04）及云南省创新办科技计划课题（2007YNCXB-01-01）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：zhangyj@mail.kib.ac.cn
收稿日期：2007-11-22，2008-02-02 接受发表
作者简介：陈可可（1959-）男，主要从事微生物研究。

普洱茶素 A 和 B，氧化咖啡因，以及核苷类成分等，普洱熟茶的特征成分显然是在微生物参与下的后发酵过程中形成的。曾有报道认为，普洱茶渥堆中存在的黑曲霉约占微生物总数的 80%（陈宗道等，1988）。周红杰等（2004）亦报道黑曲霉始终是普洱茶渥堆生产过程中的优势菌群。最近，台湾学者报道从陈年普洱茶（大红印和大黄印）中分离到若干属于游动放线菌属（*Actinoplanes*）和链霉菌属（*Streptomyces*）的菌株，发现其中的杆状链霉菌（*S. bacillaris*）和灰色链霉菌（*S. cinereus*）在接种茶叶后可提高茶多酚、氨基丁酸（GABA）和甲羟戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂 statin 的含量，后两者有防治心脑血管疾病的作用（Jeng 等，2007）。我们曾对云南产茶区普洱熟茶厂家的渥堆发酵生产进行较广泛的调查，从大量样品中分离普洱茶加工过程的微生物菌群，从中鉴定优势菌物为：温特曲霉烟色变种（*Aspergillus wentii* var. *fumeus*），帚状曲霉（*A. penicilliodes*），具黄曲霉（*A. aureolatus*），埃及曲霉（*A. egyptiacus*），臭曲霉（*A. foetidus*），日本曲霉原变种（*A. japonicus* var. *japonicus*），以及局限灰曲霉（*A. restrictus*）等（陈可可等，2006）。在我们分离鉴定的菌物中未发现黑曲霉，提示黑曲霉并未作为优势菌在普洱茶的后发酵生产中普遍存在，也可能由于曲霉属菌物的共同特征容易将多种曲霉均误鉴定为黑曲霉。迄今，对微生物在普洱茶后发酵过程中的作用尚未见严谨的试验报道。为进一步证明优势菌群在普洱茶后发酵过程中的作用及其与普洱熟茶品质的相关性，为普洱熟茶的规范化生产提供基本的知识和有用的技术，我们对优势菌种的生物学特性进行了试验研究，通过继代培养驯化野生菌株（朱宏涛等，2008a，b）。在此基础上，应用优势菌株进行普洱茶的后发酵试验，使普洱熟茶的发酵过程成为食品加工工程的现代技术，具有可操作性、规范性和可控性。本文报道应用优势菌群进行后发酵试验研究的初步结果。

1　材料和方法

1.1　试验材料

试验用茶叶为云南省临沧市云县生产的云南大叶种群体种晒青毛茶。试验用微生物温特曲霉烟色变种（*Aspergillus wentii* var. *fumeus*）（CGMCC No.1629），帚状曲霉（*A. penicilliodes*）（CGMCC No.1630），具黄曲霉（*A. aureolatus*）（CGMCC No.1631），埃及曲霉（*A. egyptiacus*）（CGMCC No.1632），臭曲霉（*A. foetidus*）（CGMCC No.1633），日本曲霉原变种（*A. japonicus* var. *japonicus*）（CGMCC No.1634），以及局限灰曲霉（*A. restrictus*）（CGMCC No.1635），均为我们从普洱茶产区后发酵生产过程中分离纯化。上述菌种均保存于中国科学院微生物研究所菌种库。发酵生产试验用菌剂为上述菌种经液体培养得到含有一定浓度的活性菌丝体（专利公开号：CN1860895A）。

1.2　菌种的制备

在无菌条件下取 1 cm×1 cm 种菌的菌块，接种于试管斜面培养基上，在 28℃条件下培养 1 周进行活化，菌丝长满斜面培养基后用于接种试验。培养基：优质马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 18 g，磷酸二氢钾 1 g，硫酸镁 0.5 g，蛋白胨 4 g，加水至 1 000 ml，灭菌前调 pH 至 5.5。

1.3　试验方法

1.3.1　接种试验　将晒青毛茶 3 kg 加水湿润至含水量 65%，分别装入 10×20 的塑料袋中，封口，在高压灭菌锅中于 121℃灭菌处理 2 h，冷却后启封，将试验用菌种分别接入茶袋中，置于 28℃的培养室中连续培养 30 天，检测外观和内质的变化。设实验组分别如下：温特曲霉烟色变种组（A），帚状曲霉组（B），具黄曲霉组（C），埃及曲霉组（D），臭曲霉组（E），日本曲霉原变种组（F），局限灰曲霉组（G），臭曲霉 + 日本曲霉原变种组（H），以及温特曲霉烟色变种 + 局限灰曲霉组（I）。同时，以未接种的晒青毛茶为对照组（J）。

1.3.2　温湿试验　将晒青毛茶 1 kg 加水湿润至含水量 65%，分别装入 10×20 的塑料袋中，封口，在高压灭菌锅中进行高温高压处理，检测外观和内质的变化。处理条件分别为：121℃ 4 h（K），121℃ 5 h（L）和 121℃ 6 h（M）。并以室温处理为对照组（N）。

1.3.3　发酵生产试验　在发酵槽中将 14 000 kg 原料毛茶摊开，将 14 L 由优势菌株培养调制的专用菌剂用清水稀释后分层均匀撒于茶叶上，用清水湿润茶叶至含水量 35%～38%，拌匀后起堆（堆高 1.2 m），pH 值在 6.0～6.5 之间，麻布盖严，进行发酵。每日测室内温度、湿度，以及堆内温度。从原料毛茶开始每周从堆中心取样 200 g，分析茶氨酸、没食子酸、茶多酚和咖啡因含量变化。

1.3.4　茶多酚、没食子酸和咖啡因含量测定　仪器与试药：SHIMADZU LC-10AD 高效液相色谱仪，检测器 SPD-M10Avp；色谱纯乙腈和甲醇，分析纯磷酸，超纯水。对照品：epigallocatechin 3-*O*-gallate（EGCG），epicatechin 3-*O*-gallate（ECG），epigallocatechin（EGC），epicatechin（EC），catechin（C），没食子酸，茶氨酸，以及咖啡因均为自行分离纯化。

表1 普洱茶后发酵样品的感官比较

Table 1 Senses comparison of Pu-Er tea during the process of post-fermentation

	外观 Appearance	汤色 Broth Colour	香气 Scent	口感 Taste
A-I	黑褐色 (brown-black)	红褐色 (brown-red)	陈香 (mellow)	微苦 (light bitter)
J	绿色 (green)	黄绿色 (green-yellow)	绿茶香 (scent of green tea)	苦、涩 (bitter and astringent)
K-M	褐色 (brown)	黄褐色 (brown-yellow)	绿茶香 (scent of green tea)	苦、涩 (bitter and astringent)
N	绿色 (green)	黄绿色 (green-yellow)	绿茶香 (scent of green tea)	苦、涩 (bitter and astringent)

样品测定：HPLC条件：色谱柱：Agilent柱（4.6×250 mm，5 μm），流动相：乙腈∶磷酸缓冲液=4∶96（梯度洗脱），检测波长：280 nm，流速：1 ml/min，柱温：30℃。

供试品溶液的制备：精密称取2.5 g粉碎的茶叶，加入100 ml 70%的甲醇溶液浸泡，超声波提取两次，每次15 min，过夜。次日过滤，滤液浓缩除去甲醇，转移至50 ml容量瓶中，加水定容，混匀。取2 ml溶液过滤，待用。再准确吸取5 ml溶液至10 ml容量瓶中，加入5 ml氯仿萃取，振荡，超声波1 min，静置，过夜。次日，取上清液经0.45 μm水膜过滤，滤液待用。

对照品溶液的制备：精密称取对照品EGCG（5.01 mg），ECG（5.04 mg），EGC（5.01 mg），EC（5.08 mg），C（5.0 mg），咖啡因（5.08 mg），分别置于10 ml容量瓶中，用水溶解，定容，得标准储备液。

样品测定：精密吸取样品共22份各10 μl，分别进行HPLC含量测定。

1.3.5 外观、汤色、香气和口感的评价方法 取1 g茶叶样品，均匀放置于白色底板的平面上，观察其叶色变化。

取3 g茶叶样品，置于150 ml烧杯中，用100℃沸水100 ml浸泡5分钟，滤出茶汤，置于白色瓷杯中观察其汤色变化。品尝滤出的茶汤，将茶汤布满舌头的各个部位，充分感受茶汤对舌头的刺激，评价其口感。通过闻茶叶叶底（滤出茶汤后的茶渣）的气味，评价其香气变化。

2 结果与讨论

在前期工作的基础上，利用从普洱茶后发酵堆中分离鉴定的优势曲霉属真菌，进行接种试验和专用菌剂的发酵生产试验，并进行了外观、汤色、香气和口感等感官观察（表1）及内含茶多酚和咖啡因的HPLC分析。

2.1 温湿度对普洱茶外观和内质的影响

温湿试验结果表明，高温高湿可引起普洱茶的感官特征发生一定变化。例如：叶色由绿色变为褐色，汤色由黄绿色变为黄褐色等，但香气和苦涩味基本不变（表1）。同时，高温处理4小时的叶色和汤色变化与高温处理5小时和6小时的无明显区别。高温高湿可引起晒青毛茶中EC，EGCG和ECG的含量显著降低，但对咖啡因的含量无明显影响（图1）。

2.2 曲霉属真菌对普洱茶外观和内质的影响

通过曲霉属真菌的接种，晒青毛茶的感官特征发生了显著的变化，叶色由绿色变为黑褐色，汤色由黄绿色变为红褐色，香气由绿茶的青香变为陈香，苦味变淡，涩味消失（表1）。除咖啡因含量没有显著变化外，EC，EGCG和ECG等主要茶多酚成分的含量显著降低（图2）。试验结果表明，茶多酚的含量变化与菌株有一定的相关性。在不同菌株的试验中，EC的含量均由晒青毛茶的1.79%降低至0.2%左右，无明显区别。但EGCG和ECG的含量则因菌株的种类而有较

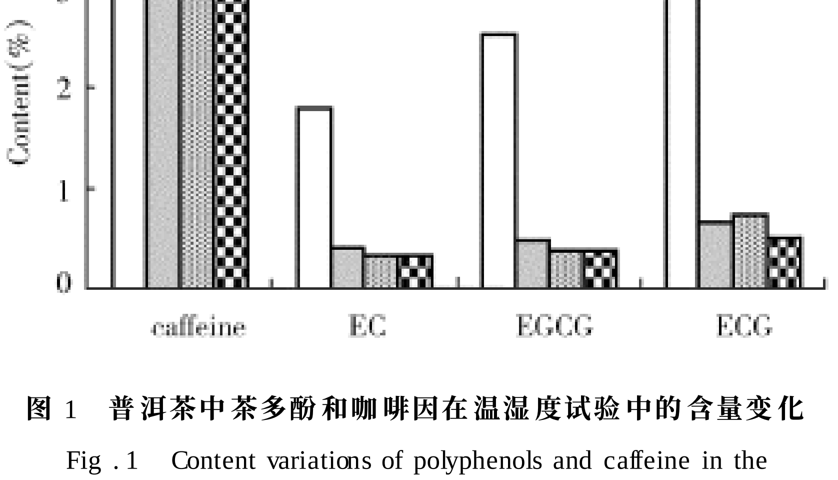

图1 普洱茶中茶多酚和咖啡因在温湿度试验中的含量变化

Fig.1 Content variations of polyphenols and caffeine in the experiments of temperature (121℃) and humidity (65%)

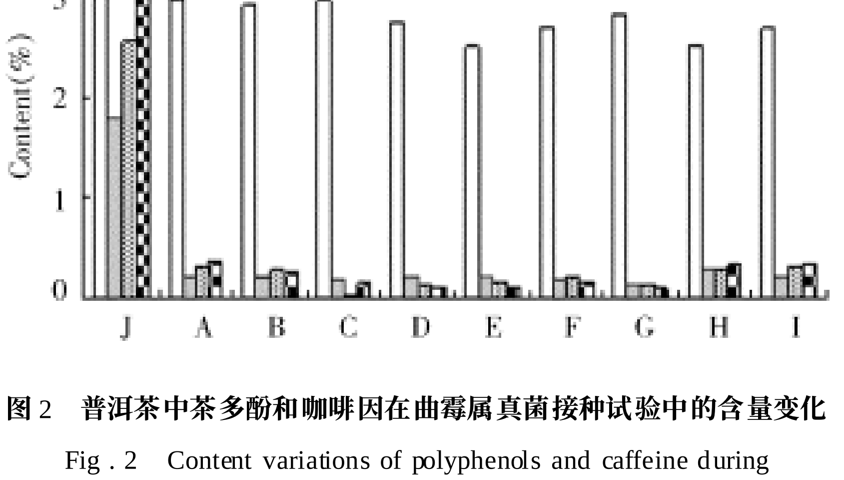

图2 普洱茶中茶多酚和咖啡因在曲霉属真菌接种试验中的含量变化

Fig.2 Content variations of polyphenols and caffeine during the experiments of *Aspergillus* inoculation

大的差异。晒青毛茶含 EGCG 达 2.548%，在温特曲霉烟色变种组（A）和温特曲霉烟色变种+局限灰曲霉组（I）中分别降低为 0.296% 和 0.305%，而在具黄曲霉组（C）中则降低到 0.024%，相差达十倍以上。同样，ECG 的含量在温特曲霉烟色变种组（A）中为 0.365%，在局限灰曲霉组（G）中为 0.084%（图 2），与晒青毛茶（3.276%）相比较，亦分别减少近 9 倍和 40 倍。以上结果证明，普洱茶的后发酵仅有高温高湿的外在因素是不可能实现的，需要在曲霉属真菌的参与下进行。而且，发酵过程中不同的优势菌物对于产品的品质与风味均有直接的关系。

2.3　曲霉属真菌在普洱茶后发酵生产中的作用

发酵生产试验进一步揭示了曲霉属真菌在发酵过程中的作用及其机制。按该试验所采用的优势菌群，保持室内温度在 25～30℃（图 3）和室内湿度为 70%～98%（图 4）的条件下进行渥堆发酵生产。由于微生物的生命活动，堆温升高快，通常在 24 小时之内即达 60℃左右，且有规律地在 45～60℃之间变化（图 3）。堆温升到 60℃左右时，需适时翻堆，调节堆内温度。堆温若高达 65℃会引起烧堆，使茶叶碳化，影响品质。

HPLC 分析结果表明，接种后第 7 日（2 批次）茶氨酸含量明显降低，从晒青毛茶的 5.343%，降低至 1.31%。随着渥堆发酵的进程，第 14 天（3 批次）仅含茶氨酸 0.023%，并逐渐消失（图 5）。没食子酸含量则随着发酵过程有不断增加的趋势，接种后第 21 日（4 批次）从晒青毛茶的 0.306% 增加到 2.037%，以后适量降低，达到相对平衡的状态（图 5）。

试验结果表明，茶多酚是渥堆发酵过程中变化最大的一类活性物质。接种后第 7 天（2 批次）EGCG 和 ECG 的含量就显著降低。接种后第 35 天（6 批次），EGCG、ECG 和 EC 的含量仅分别为 0.031%，0.059% 和 0.137%。咖啡因的含量在渥堆过程中则趋于逐渐降低的状态，但降低的幅度不大，从起始的 3.388% 到 2.236%（图 6）。

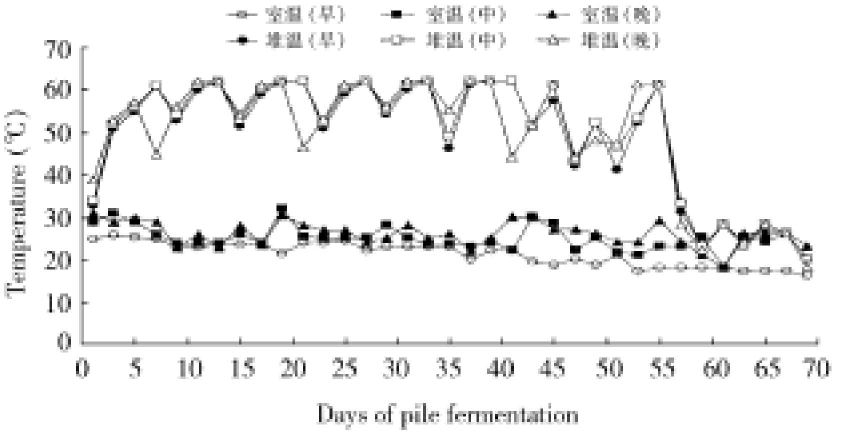

图 3　发酵生产试验室内温度和堆内温度的变化

Fig. 3　Variations of room and stack temperatures in the fermentative experiments

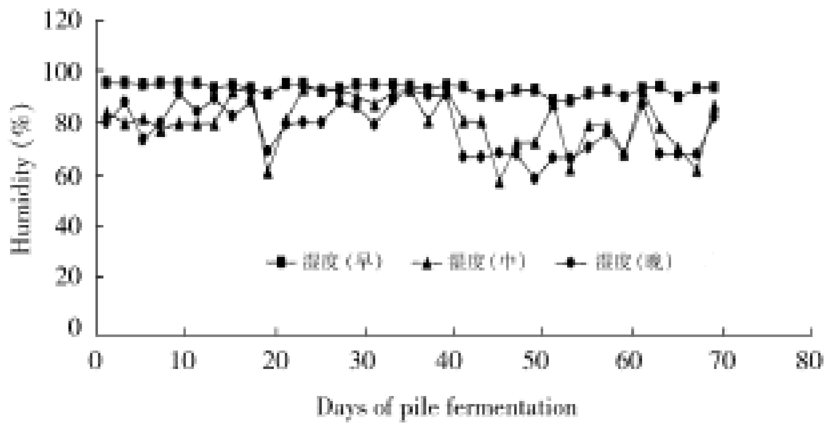

图 4　发酵生产试验室内湿度的变化

Fig. 4　Variations of room humidity in the fermentative experiments

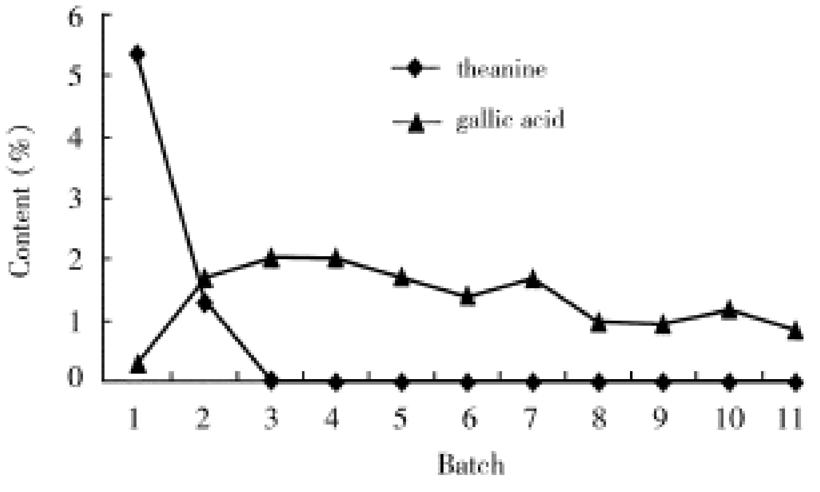

图 5　发酵生产试验中茶氨酸和没食子酸的含量变化

Fig. 5　Content variations of theanine and gallic acid in the fermentative experiments

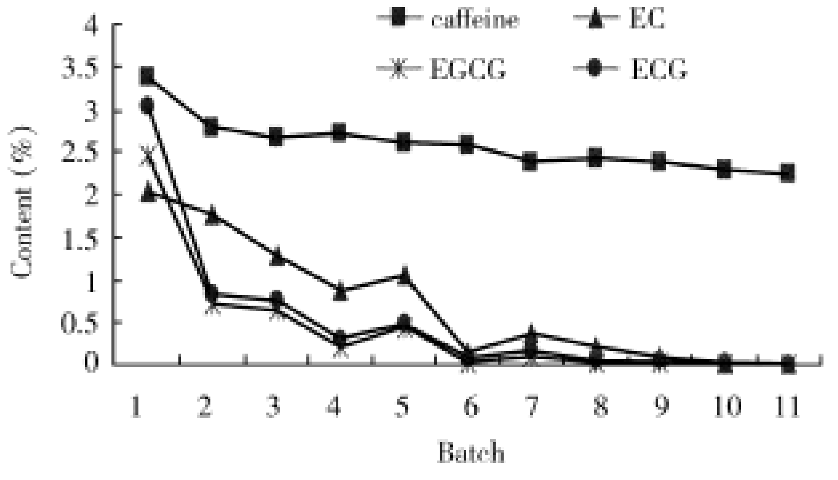

图 6　发酵生产试验中茶多酚和咖啡因的含量变化

Fig. 6　Content variations of polyphenols and caffeine in the fermentative experiments

在渥堆发酵生产过程中，室内温湿度基本稳定，呈现出一定幅度的规律性昼夜变化。而堆内温度从接种后第 2 天开始就显著升高，不受室温的影响。显然，堆温的变化是曲霉属真菌的生命活动引起的，是曲霉属真菌发酵的结果。

由于普洱茶传统的渥堆生产受季节、环境和加工条件等的限制，发酵时间通常达 50～60 余日不等，生产工艺不规范，产品质量不稳定。本试验结果显示，接种专用优势菌剂后堆内温度快速升高，适时翻堆，调节堆温，使发酵过程中堆温保持在 45～60℃之间，有利于茶叶形质的转化，接种 35 天左右即可起堆。

2.4 结论

感官评价结果表明，采用专用优势菌剂接种生产的普洱熟茶具有特殊的风味，且随晒青毛茶原料和选用菌剂的不同而有一定的差异。普洱熟茶特有的汤色，香气和口感等感官特性是曲霉属真菌与茶叶化学物质相互作用的结果。例如：普洱熟茶的陈香气是在曲霉属真菌的挥发性次生代谢产物参与下形成的。普洱熟茶特有的玛瑙红汤色是在曲霉属真菌的作用下茶多酚进行氧化和聚合反应的结果。普洱熟茶的回甘味是由于一部分茶多酚和咖啡因在后发酵过程中产生氧化和聚合反应失去涩味和苦味，而与曲霉属真菌一同产生一系列具有鲜爽回甘味的特色物质形成的。显然，进一步揭示普洱熟茶后发酵生产过程中曲霉属真菌的作用及其机制，对于普洱茶的规范化生产和知名品牌的构建，以及阐明普洱茶的生理功能等均是十分必要的。

普洱熟茶的后发酵生产，实际就是利用微生物生命活动产生的酶对茶叶原料中的化学物质进行转化的过程。目前，普洱熟茶的人工后发酵生产采用传统的渥堆方式，依靠环境微生物自然感染进行，受季节和环境条件的影响很大，参与发酵的微生物种类不明、杂菌多、发酵过程不稳定、难以控制与规范，导致产品质量不稳定，无法实现规范化生产。本试验研究结果提示，在传统渥堆后发酵方法的基础上，通过接种专用优势菌剂进行普洱茶的后发酵生产，不仅可抑制杂菌和有害菌群的生长，使生产过程不受季节、环境条件等外界因素的影响，而且能缩短发酵时间，提高效率，保证产品质量的稳定性，提升普洱茶加工技术，使普洱熟茶的规范化、工业化生产成为可能。

致谢 云南省临沧市云县森野茶叶公司提供试验用茶叶样品和后发酵试验条件。

〔参 考 文 献〕

陈宗道，刘勤晋，周才琼，1988. 微生物与普洱茶发酵 [J]. 中国茶叶，(4)：4—7

Chen KK (陈可可), Zhu HT (朱宏涛), Wang D (王东) *et al.*, 2006. Isolation and identification of *Aspergillus* species from the post fermentative process of Pu-Er ripe tea [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **28** (2)：123—126

Jeng KC, Chen CS, Fang YP *et al.*, 2007. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh Tea [J]. *J Agric & Food Chemistry*, **55** (21)：8787—8792

She GM (折改梅), Chen KK (陈可可), Zhang YJ (张颖君) *et al.*, 2007. The occurrence of 8-oxocaffeine and pyrimidine alkaloids in Pu-Er ripe tea [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **29** (6)：713—716

Zhou HJ (周红杰), Li JH (李家华), Zhao LF (赵龙飞) *et al.*, 2004. Study on main microbes on quality formation of Yunnan Pu-Er tea during pile-fermentation process [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), **24** (3)：212—218

Zhou ZH (周志宏), Yang CR (杨崇仁), 2000. Chemical constituents of crude green tea, the material of Pu-Er tea in Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **22** (3)：343—350

Zhou ZH (周志宏), She GM (折改梅), Zhang YJ (张颖君) *et al.*, 2006. Aromatic constituents of Pu-Er tea [J]. *Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), **18** (Suppl)：5—8

Zhu HT (朱宏涛), Chen KK (陈可可), Wang D (王东) *et al.*, 2008a. The effects on growth in solid culture of *Aspergillus japonicus* var. *japonicus*, a preponderant microbe during the post fermentative process of Pu-Er ripe tea [J]. *Natur Prod Res Develop* (天然产物研究与开发), accepted

Zhu HT (朱宏涛), Chen KK (陈可可), Wang D (王东) *et al.*, 2008b. The biological characteristics of *Aspergillus foetidus* (Moniliaceae), a preponderant microbe during the post fermentative process of Pu-Er tea [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **30** (4)：510—514